

Universidade Do Mindelo

Escola Superior De Saúde

Licenciatura em Ortóptica e Ciências da Visão

**Caracterização Funcional e Estrutural de Pacientes com
Neuropatia Óptica Hereditária de Leber
- Um estudo de “Follow-up” -**

Projeto de Investigação em Ortóptica

Discente: Andreia S. Abreu dos Santos, nº 3268

Orientadora: Prof.^a Doutora Aldina Reis

Andreia Soraia Abreu dos Santos

Caracterização Funcional e Estrutural de Pacientes com
Neuropatia Óptica de Leber
- Um estudo de “Follow-Up” -

Projeto de Investigação em Ortóptica elaborado no âmbito do Curso de Licenciatura em Ortóptica e Ciências da Visão, da Universidade do Mindelo, como requisito para a obtenção do título de Ortopista.

Orientadora: Prof.^a Doutora Aldina Reis

Mindelo, 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu Pai Celeste, por acompanhar-me em toda minha jornada, por me conceder a bênção da saúde e me presentear com pessoas certas no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, por todo o esforço e apoio que me deram ao longo desses 4 anos de Licenciatura.

Agradeço aos professores, nomeadamente ao Professor Manuel de Oliveira e Professor Luís Mendanha, pela paciência e dedicação; por lutarem pela qualidade da Licenciatura; por estarem sempre disponíveis para partilharem o conhecimento. Obrigada pelo exemplo de luta e perseverança.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Aldina Reis, pelo apoio incondicional e confiança depositada em mim.

Agradeço ao Professor Pina pelo o auxílio prestado, para a elaboração da análise dos dados feita neste projeto.

Agradeço aos meus amigos, Elton Baía, Emily Mendes e Kenny Oliveira, por me aturarem nesses 4 anos, por serem meus companheiros fiéis nessa jornada, dando-me suporte para aguentar os momentos de mais estresse. Obrigada por me ajudarem, consolarem, ouvirem e me proporcionarem os melhores momentos na UM. Gostaria de deixar um agradecimento muito especial à minha amiga e colega Kleusa Vanine; sem o seu auxílio a conclusão desse projeto seria impossível.

E por último, mas não menos importante, um agradecimento especial ao meu namorado, por fazer-me companhia nas noites mal dormidas, por ouvir minhas frustrações, por sempre saber o que dizer e por estar do meu lado.

Índice

ABREVIATURA.....	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUÇÃO	13
II. RETINA E NERVO ÓTICO: ASPETOS GERAIS.....	15
2.1. Retina.....	15
2.1.1. Camadas Microscópicas da Retina	16
2.1.2. Organização celular da retina.....	17
2.1.2.1. EPR	17
2.1.2.2. Fotorreceptores	17
2.1.2.3. Interneurônios	18
2.1.2.4. Células Gliais	19
2.1.2.5. Células Ganglionares (CG).....	19
2.2. Nervo ótico	20
III. NEUROPATIAS ÓTICAS.....	22
3.1. Neuropatias Óticas Isquêmicas.....	22
3.2. Neuropatias Inflamatórias.....	22
3.3. Neuropatia Ótica Traumática	23
3.4. Neuropatias Tóxicas e Nutricionais.....	23
3.5. Neuropatias Compressivas	23
3.6. Neuropatias Óticas Hereditárias.....	24
IV. NEUROPATIA ÓTICA HEREDITÁRIA DE LEBER	25
4.1. Neuropatologia	25
4.2. Histopatologia.....	25
4.3. Características Bioquímicas e Fisiopatologia.....	26
4.4. Características clínicas	27

4.4.1. Fase aguda.....	27
4.4.2. Fase crónica.....	27
4.4.3. Outras associações.....	28
4.5. Diagnóstico e Tratamento	28
4.6. Prognóstico	29
V. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1. Caracterização dos pacientes.....	30
5.2. Avaliação Funcional	30
5.2.1. Sensibilidade ao Contraste Cromática Computorizado- Cambridge Colour Test (CCT)	30
5.2.2. Sensibilidade ao Contraste Acromática Computorizado- Metropsis	31
5.2.3. Perimetria Estática Computorizada	32
5.2.4. PEV Pattern.....	33
5.2.5. ERG Pattern	34
5.2.6. ERG multifocal	35
5.3. Avaliação Estrutural.....	36
5.3.1. Retinografia	36
5.3.2. Tomografia de coerência ótica (OCT)	36
5.4. Análise Estatística.....	37
VI. RESULTADOS.....	38
6.1. Caracterização dos pacientes.....	38
6.2. Avaliação funcional.....	38
6.2.1. Sensibilidade ao Contraste Cromática Computorizado.....	38
6.2.2. Sensibilidade ao Contraste Acromática Computorizado	39
6.2.3. Perimetria Estática Computorizada	39
6.2.4. PEV pattern	40
6.2.5. ERG pattern.....	44

6.2.6. ERG multifocal	45
6.3. Avaliação Estrutural.....	46
6.3.1. Tomografia de coerência ótica (OCT)	46
VII. DISCUSSÃO	48
VIII. CONCLUSÕES.....	49
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Índice de Tabela

Tabela 1- Teste de Wilcoxon. Rejeita-se a hipótese nula para o eixo protan.....	38
Tabela 2-Teste de Wilcoxon. O comprometimento das baixas e altas frequências apresentam valores de $p < 0,05$	39
Tabela 3- Resultados do teste T de Student para amostras emparelhadas.....	40
Tabela 4- Teste de Hipótese T para amostras emparelhadas; $p > 0.05$ para todos os pares.	41
Tabela 5-Comparação do tempo implícito para a onda P100, nos diferentes grupos.	41
Tabela 6-Comparação da amplitude das ondas N75-P100, nos diferentes grupos.	43
Tabela 7- Teste de hipótese T de Student para amostras emparelhadas. Diferença das médias da amplitude N75-P100, para ambos estímulos, revelam-se estatisticamente significativas.	43
Tabela 8- Média das amplitudes das ondas N35-P50 de 2017 encontram-se superiores, que os valores obtidos em 2010.	44
Tabela 9- Diferença das médias das amplitudes das ondas P1, nos diferentes anéis do ERGmf.....	45

Índice de Gráficos

Gráfico 1- Comparação dos eixos cromáticos entre os diferentes grupos.	39
Gráfico 2- Comparação dos resultados obtidos em 2010 (NOHL1) e 2017 (NOHL2).	40
Gráfico 3-Comparação entre o tempo implícito das ondas P100, dos diferentes grupos.	42
Gráfico 4-Comparação entre as amplitudes da onda P100, dos diferentes grupos.	43
Gráfico 5-Comparação de médias das amplitudes das ondas P50 e N95, como o ratio N95/P50, nos diferentes grupos.....	44
Gráfico 6- Comparação da amplitude da onda P1 dos diferentes anéis, entre os três grupos.	46
Gráfico 7- comparação da espessura dos aneis centrais, pericentrais e periféricos, nos diferentes grupos.	47

ABREVIATURA

ATP- Adenosina- trifosfato

AV- Acuidade visual

CCG- Camada das Células Ganglionares

CCT- Cambridge Colour Test

CFN- Camada de Fibras Nervosas

CFNR- camada de fibras nervosas da retina

CG- Células Ganglionares

CGL- Corpo geniculado lateral

CNE- Camada Nuclear Externa

CNI- Camada Nuclear Interna

CPE- Camada Plexiforme Externa

CPI- Camada Plexiforme Interna

dB- Decibéis

EPR- Epitélio Pigmentar da Retina

ERG- Eletrorretinograma

MLE- Membrana Limitante Externa

mm- Milímetro

NO- Nervo ótico

NO- Neuropatias Ópticas

NOC- Neuropatia Óptica compressiva

NOHL- Neuropatia Óptica Hereditária de Leber

NOI- Neuropatias Ópticas Isquémicas

NOIA- Neuropatias Ópticas Isquémicas Anterior

NOIP- Neuropatias Ópticas Isquémicas Posteriores

NOT- Neuropatia Óptica Traumática

OCT- Tomografia de Coerência Óptica

PEC - Perimetria Estática Computorizada

SC - Sensibilidade ao Contraste

SNC - Sistema Nervoso Central

RESUMO

A alteração na posição do nucleotídeo G para A, no gene 11778 da subunidade ND4, do complexo I foi a primeira mutação no genoma mitocondrial descrita, e associada a uma patologia humana. A Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (NOHL) consiste numa patologia rara, de herança materna, que afeta o nervo óptico e é frequentemente associada à perda de visão central bilateral, em indivíduos jovens do sexo masculino. Na verdade, a gravidade clínica e respetivo impacto na acuidade visual variam entre casos assintomáticos e a cegueira completa. Esta patologia encontra-se, atualmente, classificada em primária (G3460A, G11778A e T14484C) e representa 95% dos casos, ou secundárias conforme o risco de desenvolver a doença. No presente estudo, foram utilizados métodos psicofísicos (sensibilidade ao contraste cromático e acromático, perimetria estática computadorizada), eletrofisiológicos (PEV pattern, ERG *pattern* e ERGmf) e de avaliação estrutural (retinografia e OCT) num grupo de 13 pacientes, portadores da mutação mitocondrial G11778A, que já haviam sido submetidos num estudo para caracterização o fenótipo visual inicial de portadores de LHON assintomático. O presente estudo teve por objetivo o “*follow-up*” desses pacientes; isto é, avaliar e comparar os resultados obtidos no ano de 2010 com os encontrados em 2017. No final do estudo, conclui-se que as células das vias parvocelular e magnocelular apresentavam alterações significativas. Além disso, as respostas retinocorticais apresentaram anormais.

Palavras-chaves: Neuropatia Óptica Hereditária de Leber; mutação mitocondrial; células ganglionares; métodos psicofísicos; eletrofisiologia.

ABSTRACT

A G to A transition at nucleotide 11778 in the ND4 subunit gene of complex I was the first point mutation in the mitochondrial genome linked to a human disease. Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is a rare, maternal inheritance pathology that affects the optic nerve and is often associated with bilateral central vision loss in young male subjects. In fact, clinical severity and its impact on visual acuity vary between asymptomatic cases and complete blindness. This pathology is currently classified as primary (G3460A, G11778A and T14484C) and accounts for 95% of cases, or secondary to the risk of developing the disease. In the present study, there were psychophysical methods (sensitivity to chromatic and achromatic contrast, computerized static perimetry), electrophysiological (PEV standard, ERG and ERGmf standard) and structural evaluation (retinography and OCT) in a group of 13 patients with mitochondrial mutation, G11778A, who had already undergone a study to characterize the initial visual phenotype of patients with asymptomatic LHON. The goal of the present study is to "follow-up" these patients. In other words, it is supposed to evaluate and compare the results obtained in the year 2010 with those found in 2017. At the end of the study, it was concluded that the cells of the parvocellular and magnocellular pathways presented significant alterations. In addition, the retinocortical responses presented abnormalities.

Keywords: Leber Hereditary optic neuropathy; mitochondrial mutation; ganglion cells; psychophysical methods; electrophysiology.

I. INTRODUÇÃO

Em 1871, o oftalmologista alemão -Theodor Leber- publicou pela primeira vez, uma descrição detalhada sobre um padrão característico de perda visual entre os membros de quatro famílias, e as suas observações foram, posteriormente, confirmadas em *pedigrees* de diferentes populações. Estes estudos iniciais destacaram vários dos aspetos salientes da Neuropatia Ótica Hereditária de Leber (NOHL), incluindo a transmissão materna da doença (independentemente se a mãe apresenta ou não alterações na visão), a predominância em indivíduos de sexo masculino para a perda visual e o envolvimento quase exclusivo do nervo ótico (Man *et al*, 2017). Atualmente, reconhece-se o padrão de transmissão materna como fator etiológico primário, e está relacionada com mutações dentro do genoma mitocondrial (molécula de DNA pequena que codifica 13 subunidades de proteína dos complexos da cadeia respiratória) (Howell, 1996).

O primeiro estudo epidemiológico sobre NOHL, realizado no Nordeste de Inglaterra, revelou que a prevalência de doentes era de 1:31000 indivíduos e que 1 em 8500 eram portadores de mutações ligadas à NOHL. Noutras populações europeias observaram-se valores semelhantes: 1:50000 afetados e 1:9000 portadores na Finlândia, e 1:39000 afetados na Holanda. Uma meta-análise recente estimou a prevalência de NOHL na europa em 1:45000 indivíduos (Gil e Silva, 2014).

Alguns portadores assintomáticos de NOHL apresentam alterações fundoscópicas, como telangiectasias na região peripapilar. A tomografia de coerência ótica (OCT) do disco revela nalguns casos espessamento da camada de fibras nervosas da retina (CFNR). Observa-se igualmente uma variabilidade da espessura da CFNR em portadores de NOHL, quando medida em diferentes momentos. Trata-se de um espessamento não inflamatório, pseudoedematoso, que está provavelmente relacionado com a combinação entre um aumento compensatório da biogénese mitocondrial e estase axonal (Gil e Silva, 2014).

O estudo que será descrito neste documento, foi feito em 13 pacientes assintomáticos, portadores da NOHL. Para tal, foram aplicados:

- métodos psicofísicos para a avaliação da sensibilidade ao contraste cromático, nos diferentes eixos (Cambridge Colour Test – vias parvocelular e coniocelular), da sensibilidade ao contraste acromático, para diferentes frequências espaciais (Metropsis Contrast Sensitivity Function Test, e ainda, fez-se a perimetria estática computadorizada;

- métodos eletrofisiológicos que envolveram o eletrorretinograma pattern (para estudo das células ganglionares), o eletrorretinograma multifocal (avaliação da função pré- gangionar) e os potenciais evocados visuais pattern (para o registo do processamento retinocortical);

- métodos de avaliação estrutural, nomeadamente a retinografia e a tomografia de coerência óptica.

O presente estudo teve por objectivo fazer o “*follow-up*” dos pacientes portadores de NOHL, e comparar os resultados obtidos com os anteriores.

II. RETINA E NERVO ÓTICO: ASPETOS GERAIS

2.1. Retina

O olho humano é formado por um conjunto complexo de elementos que atuam de forma específica para que o ato de olhar e de ver ocorra. É composto por três camadas ou túnicas:

- a camada externa ou túnica fibrosa, constituída pela esclerótica, e na sua parte anterior pela córnea;
- a camada média ou túnica coroideia, formado pelo corpo ciliar e íris;
- camada interna ou túnica nervosa, esta correspondendo à retina.

Embriologicamente parte do Sistema Nervoso Central (SNC), a retina é a parte do cérebro humano que se encontra melhor descrita na literatura, graças ao seu acesso fácil que permite o seu estudo, tanto por parte dos cientistas como por parte dos clínicos (Fielder, 2011).

A retina, com exceção dos vasos sanguíneos que a percorrem, é transparente, ao examinador, até sua camada externa, o epitélio pigmentar da retina. A porção transparente da retina é conhecida como a retina neurosensorial. Esta encontra-se aderida ao epitélio pigmentar da retina, apenas nas margens do nervo ótico (NO) e da ora serrata. Próximo ao centro da retina posterior encontra-se uma pequena mancha amarela, a mácula lútea, com cerca de 4mm de diâmetro. Na parte central da mácula está uma pequena depressão, a fóvea, e representa a região retiniana com maior acuidade visual, uma vez, que as células fotorreceptoras, nomeadamente os cones são mais abundantes nesta porção da retina. Estes possuem uma estrutura especial que auxilia na deteção de detalhes de imagem. Isto é, os cones da fóvea têm corpos celulares especialmente longos e delgados, distinguindo-se dos cones muito maiores localizados mais periféricamente na retina. Os axónios longos dos cones foveais formam a camada de Henle e irradiam para fora da depressão central. Na porção mais nasal, está a papila ótica, através da qual os vasos sanguíneos entram no olho e se espalham na superfície da retina. É também o ponto onde os prolongamentos nervosos da retina sensorial encontram-se, atravessam as duas túnicas mais externas e saem

do olho como nervo ótico. A papila ótica não contém células fotorreceptoras e não responde à luz, sendo, por isso chamada de ponto cego do olho.

2.1.1. Camadas Microscópicas da Retina

Em 1892, o anatomista espanhol Ramon y Cajal descreveu pela primeira vez diferentes células nervosas, que faziam parte das camadas neurais da retina e que contribuíam para os processos sinápticos. Suas descobertas basearam-se na técnica de coloração de prata de Golgi (inventada pelo, também anatomista, Camilo Golgi), que tinha a vantagem de isolar, individualmente, as células nervosas. Ele propôs, ainda, que as células bipolares da retina estivessem envolvidas na transmissão de informação de cones e bastonetes, ao longo da via vertical, enquanto que, as células horizontais e amácrinas estivessem envolvidas nas interações verticais (Kolb, 1994).

A retina é composta por 10 camadas microscópicas diferentes, cada uma contendo várias estruturas:

1. Camada Limitante Interna: contém fibras das células gliais que separam a retina do corpo vítreo; é constituído por astrócitos e células d Müller que formam a lâmina basal;
2. Camada de Fibras Nervosas (CFN): consiste em fibras axônicas de células ganglionares, que se encaminham para a cabeça do nervo ótico;
3. Camada das Células Ganglionares (CCG): formado por núcleos de células ganglionares, cujos axônios se tornam fibras do nervo ótico.
4. Camada Plexiforme Interna (CPI): local onde se dão sinapses entre dendritos de células ganglionares, células amácrinas e axônios de células bipolares;
5. Camada Nuclear Interna (CNI): onde é possível encontrar núcleos de células horizontais, bipolares e amácrinas;
6. Camada Plexiforme Externa (CPE): camada onde acontecem sinapses entre os axônios de cones e bastonetes, dendritos de células horizontais e células bipolares
7. Camada Nuclear Externa (CNE): composto pelos corpos das células fotorreceptoras;

8. Membrana Limitante Externa (MLE): camada que separa o segmento interno dos fotorreceptores dos seus núcleos;

9. Fotorreceptores: este contém os cones e bastonetes;

10. Epitélio Pigmentar da Retina (EPR): camada mais externa da retina, composta por células contendo melanina, que absorvem a luz e diminuem a sua dispersão dentro do olho.

2.1.2. Organização celular da retina

A retina é composta, maioritariamente, por células do epitélio pigmentar da retina, células fotorreceptoras, interneurônios, células ganglionares e células gliais.

2.1.2.1. EPR

Tal como os componentes sensoriais da neuroretina, as células do EPR, tem origem embrionária da neuroectoderma. A densidade das células da EPR varia ao longo da retina, sendo maior na fóvea (5.000 células/mm²) do que na periferia (2.000 células/mm²). Na retina central, onde estas células se encontram mais agrupadas, elas tomam a forma hexagonal, dando origem a uma única camada de epitélio cuboide. A presença de “*tight junctions*” entre as células do EPR adjacentes formam barreira hematorretiniana externa, que facilita o fluxo livre de moléculas entre a coriocapilar e os fotorreceptores da neuroretina.

2.1.2.2. Fotorreceptores

Estas são considerados os sensores do sistema visual, que captam a energia dos fotões e convertem em sinal nervoso, durante o processo da fototransdução. A retina humana contém aproximadamente 4 a 5 milhões de cones e 77 a 107 milhões de bastonetes. Entre os três tipos de cones, os vermelhos são mais comuns que os verdes e azuis. Cada fotorreceptor consiste num segmento externo (fotopigmento), segmento interno (mitocôndria e retículo endoplasmático), núcleo, fibra interna (análogo ao axônio) e o terminal sináptico.

O glutamato é o neurotransmissor sináptico dos fotorreceptores e é liberado em resposta à despolarização. Esta despolarização acontece em ambiente

escotópico, enquanto que a fototransdução resulta da hiperpolarização. Os terminais dos fotorreceptores interagem com fotorreceptores vizinhos e interneurônios (células horizontais e bipolares) e desempenham um importante papel na transmissão e processamento das informações visuais na retina.

A via visual dos cones às células ganglionares funciona diferentemente da via dos bastonetes. Isto é, os neurónios e fibras neurais que conduzem os sinais visuais para os cones são consideravelmente maiores do que os que conduzem os sinais visuais para visão dos bastonetes, e os impulsos são conduzidos ao cérebro duas a cinco vezes mais rapidamente. O circuito dos cones envolve três neurónios (cones- células bipolares- células ganglionares), enquanto que, o circuito dos bastonetes consiste em quatro diferentes (bastonetes- células bipolares- células amácrinas- células ganglionares).

2.1.2.3. Interneurônios

Os interneurônios conectam a camada de fotorreceptores com a camada de células ganglionares. Estes interneurônios consistem nas células bipolares, horizontais, amácrinas e células interplexiformes, que formam um circuito neurorretiniano na camada plexiforme interna para processar os sinais dos fotorreceptores e transmitem a informação para a camada de células ganglionares.

As células bipolares podem ser classificadas, segundo o seu comportamento perante o glutamato, em hiperpolarizantes (OFF- center) ou despolarizante (ON-center).

Os fotorreceptores também interagem com células horizontais na CPE. As células horizontais ligam-se lateralmente aos terminais sinápticos dos bastonetes e cones, bem como aos dendritos das células bipolares; elas são sempre inibitórias.

As células amácrinas são classificadas consoante o tamanho dos seus campos dendríticos horizontais e podem ser uni-, bi- ou multiestratificada criando conexões dentro e entre diferentes estratos da CPI (que é o local onde fazem as suas sinapses).

Outro interneurônios na camada nuclear interna, as células interplexiformes, possuem processos que se estendem desde a camada plexiforme interna até a camada plexiforme externa (Fielder, 2011).

Sendo assim, ao longo do trajeto até a célula ganglionar, os sinais são transmitidos e modificados pelas células bipolares, horizontais, amácrinas e interplexiformes, como parte do processamento visual dentro da retina.

2.1.2.4. Células Gliais

Na retina é possível encontra 4 tipos de células gliais: células Müller, astrócitos, microglia, e, ocasionalmente, os oligodendrócitos.

O corpo celular das células Müller encontra-se localizado na camada nuclear interna, com processos celulares que abrangem toda a neurorretina. As extensões proximais dessas células expandem-se e achatam-se de modo a marcar o fim da lâmina basal que forma a camada limitante interna. Distalmente, as extensões de Müller dão origem à membrana limitante externa, formando uma série de complexos juncionais. Já as extensões laterais dessas células cercam os neurônios da retina. As células Müller desempenham, ainda um papel fundamental, na manutenção do ambiente local, por forma a otimizar o funcionamento do processo visual. Sabe-se que os astrócitos derivam de células-tronco do nervo ótico e são encontrados nas camadas superficiais da neurorretina, onde envolvem células ganglionares, fibras nervosas e vasos sanguíneos retinianos superficiais. As microglias são células fagocíticas e fazem parte do sistema reticulo-endotelial. Já os oligodendrócitos dão origem à bainha de mielina no sistema nervoso periférico. Embora geralmente não mielinizadas, as fibras nervosas da retina ocasionalmente são observadas com mielina, indicando que os oligodendrócitos podem atingir a retina em certas condições (Fielder, 2011).

2.1.2.5. Células Ganglionares (CG)

Estas células são responsáveis pela transmissão da informação visual da retina até o cérebro. Em 1953, Barlow e Kuffer, descobriram de forma independente que algumas células ganglionares possuem uma organização espacial antagônica,

em que um centro excitatório é emparelhado com uma “periferia” inibitória, ou vice-versa. A organização centro-periferia filtra a imagem, enfatizando o contraste espacial. Em retinas de primatas, muitas células ganglionares também transmitem informações cromáticas ao informar a diferença entre o “input” do cone vermelho e do verde, ou a diferença entre o “input” do cone azul e a soma dos “inputs” dos cones vermelho e verde (Xiang *et al*, 1996).

Já foram descritos cerca de 20 tipos de células ganglionares; no entanto, os mais conhecidos são as do tipo “midget” - também conhecida como célula P- e do tipo “parasol” - célula M. As células do tipo P e M diferem em várias propriedades. As células ganglionares M possuem árvores dendríticas mais extensas, e projetam-se para as camadas magnocelulares do corpo geniculado lateral (CGL), enquanto que as células P se dirigem para as camadas parvocelulares (Fielder, 2011). As células ganglionares M, respondem de forma não linear. Em termos gerais, as células P são caracterizadas por velocidades de condução relativamente lentas, insensibilidade para pequenas mudanças no contraste e alta resolução espacial, especialmente perto da fóvea. Em contraste, as células M são caracterizadas pela transmissão de informação relativamente rápida, sensibilidade a pequenas mudanças no contraste e baixa resolução espacial. Estas células possuem, ainda, campos recetivos com centro-periferia acromáticos e, portanto, não respondem ao contraste cromático (Xiang *et al*, 1996).

Os axônios de células ganglionares convergem e definem as fibras nervosas, adquirindo um arranjo arqueológico ao redor da fóvea, temporalmente ao disco ótico, dividindo, desse modo, a retina em duas metades altitudinais, formando um meridiano horizontal. As fibras que vêm de CG na metade nasal da retina projetam-se diretamente no disco ótico, numa linha direta de cada ponto de origem. Já as fibras maculares vão diretamente para a parte temporal do disco ótico (Reis, 2012).

2.2. Nervo ótico

A retina transmite os impulsos elétricos, através do nervo ótico que é constituído pelos axónios que surgem nas células ganglionares da retina. Está na posição intraorbitária ou retrobulbar e sai da orbita pelo buraco ótico, tendo, então,

a sua porção intracanalicular e que se estende na sua porção intracranial até o quiasma. Esses impulsos elétricos vão passar no quiasma, em que a sua estrutura corresponde ao cruzamento dos nervos ópticos. De modo simplificado, admite-se que as fibras temporais de cada retina seguem um trajeto direto e que as fibras nasais se cruzam. Esse cruzamento parcial das fibras retínicas é que se possibilita a visão binocular, isto é, proporciona o cruzamento de fibras nasais para o trato óptico contralateral, bem como, a passagem de fibras temporais para o trato óptico ipsilateral. O trato óptico são feixes nervosas reorganizados depois do quiasma, contendo as metades homônimas (esquerda ou direita) e ipsilaterais das retinas de cada olho, contornando os pedúnculos cerebrais e terminam nos corpos geniculados laterais. Nos corpos geniculados laterais surge novas sinapses, cujas suas funções não são ainda bem conhecidas, mas sabe-se que as ligações neuronais ocorrem em disposições bem estratificadas e a organização se torna ainda maior (Bicas, 1997).

As camadas geniculares estão organizadas para separar os influxos das células P e M bem como os influxos de cada olho. As células P projetam-se principalmente para as camadas parvocelular (mas também para as camadas M), e as células M apenas para as camadas magnocelular, e as células K projetam-se para pequenas células entre as lâminas (a zona cónio-celular). Funcionalmente, elas representam um grupo muito complexo. Os neurónios geniculares projetam-se diretamente para a área visual primária V1 do pólo occipital do córtex cerebral (Mackay, 2003).

III. NEUROPATIAS ÓTICAS

As Neuropatias Óticas (NO) estão relacionadas com mecanismos que causam danos axonais no nervo óptico, apresentando alterações na aparência do mesmo, associadas a características como diminuição da acuidade visual, defeito do campo visual, visão de cor alterada e, em casos da NO ser unilateral, o defeito pupilar aferente relativo poderá estar presente (Reis, 2012).

As afeções da via ótica anterior representam importantes diagnósticos em neuroftalmologia e incluem doenças de origem inflamatória, desmielinizante, isquêmica, compressiva, tóxicas, nutricionais, hereditárias ou traumáticas que acometem os nervos óticos, quiasma ótico, trato ótico e corpo geniculado lateral. A avaliação clínica destas afeções envolve tanto testes subjetivos da função visual, como a acuidade e o campo visual, quanto métodos objetivos que avaliem suas alterações estruturais (Behbehani, 2007; Monteiro, 2012).

3.1. Neuropatias Óticas Isquêmicas

As neuropatias óticas isquêmicas (NOI) são as neuropatias óticas mais comuns em indivíduos acima dos 50 anos de idade. As NOI podem ser classificadas de acordo com a localização da lesão isquêmica no nervo óptico, em:

- anterior (NOIA), quando envolve o disco óptico e apresenta-se com edema do disco óptico;
- posterior (NOIP), quando envolve a porção intraorbitária, intracanalicular ou intracraniana do nervo óptico, e se apresenta sem edema do disco óptico.

As NOIA podem, também, ser classificadas de acordo com sua etiologia, em arterítica, não arterítica e perioperatória (Meira, 2014).

3.2. Neuropatias Inflamatórias

As neuropatias inflamatórias são frequentes e englobam as doenças desmielinizantes, idiopáticas ou infecciosas. Na fase aguda o disco pode apresentar-se normal ou edema discreto ou moderado. Podem ocorrer também exsudados. A

perda da CFNR começa após um mês da crise de neurite ótica e continua por 3 a 6 meses quando então aparecem os defeitos na camada de fibras. Existe uma preferência para o acometimento do setor temporal, com perda importante do feixe papilomacular (Monteiro,2012).

3.3. Neuropatia Ótica Traumática

A neuropatia ótica traumática (NOT) é uma condição grave que pode ser uni ou bilateral e pode ocorrer por mecanismo direto ou indireto. Traumatismo direto resulta de lesões penetrantes na órbita enquanto que o trauma indireto resulta de traumatismo fechado no qual a onda de choque atua no canal óptico levando à perda visual. A perda visual geralmente ocorre associada a lesões frontais ou temporais. Pode haver melhora visual, particularmente no trauma indireto do nervo óptico, mas isso nem sempre ocorre (Soares *et al*, 2014; Monteiro, 2012).

3.4. Neuropatias Tóxicas e Nutricionais

As neuropatias óticas tóxicas e nutricionais se manifestam de forma semelhante no disco óptico. De modo geral, estas afecções apresentam em comum a perda visual, geralmente, bilateral, indolor, insidiosa e progressiva, ou, em casos específicos, de aparecimento súbito (como no caso da ingestão de metanol), com perda de campo visual, apresentando características típicas como o escotoma central ou cecocentral, preservando a periferia (Monteiro, 2012).

3.5. Neuropatias Compressivas

Qualquer lesão extrínseca que comprima algum dos segmentos do NO, pode provocar lesão na via ótica e dar origem à neuropatia ótica compressiva (NOC). O nervo ótico é mais vulnerável à compressão nas regiões adjacentes ósseas ou nos locais confinados (ápex orbitário e/ou canal ótico). A avaliação inicial deve incluir a confirmação da disfunção visual e o estudo neuro-imagiológico para determinar a natureza, a localização e a extensão da patologia, de modo a permitir uma terapêutica específica para a etiologia. A NOC tem uma apresentação clínica muito

diversa; mas, habitualmente surge com disfunção do nervo ótico de instalação lenta e progressiva. No entanto, em alguns casos pode ocorrer uma diminuição aguda ou subaguda da função visual e requerer uma avaliação urgente (Ferreira e Cunha, 2014).

3.6. Neuropatias Óticas Hereditárias

As neuropatias óticas hereditárias compreendem um conjunto heterogêneo de doenças genéticas cuja manifestação clínica principal é a atrofia ótica. Esta atrofia resulta da perda dos axónios das células ganglionares e alteração do suporte microvascular. A gravidade clínica e respetivo impacto na acuidade visual variam entre casos assintomáticos e cegueira completa. As causas hereditárias de neuropatia ótica podem ocorrer como um evento primário, ou serem secundárias à compressão (observadas em associação com os gliomas do nervo ótico na neurofibromatose) ou degenerescência retiniana (observada nos estádios terminais das retinopatias pigmentares). A atrofia ótica primária pode ocorrer como um evento isolado ou em associação a manifestações sistémicas (ex. surdez neurosensorial). As principais variantes são a neuropatia ótica de Leber (NOHL), de hereditariedade mitocondrial, e a atrofia ótica autossómica dominante de Kjer. A disfunção mitocondrial parece ser o denominador comum das neuropatias óticas. A anatomia da lâmina cribrosa associada às exigentes necessidades energéticas das células ganglionares torna-as particularmente suscetíveis à apoptose (Gil e Silva, 2014).

Ao longo deste documento, serão elucidados alguns aspetos referentes à NOHL.

IV. NEUROPATIA ÓTICA HEREDITÁRIA DE LEBER

Até a data, estão descritas 17 mutações diferentes no DNA mitocondrial associadas ao LHON, que são classificadas em primárias (G3460A, G11778A e T14484C) ou secundárias conforme o risco de desenvolver a doença. As primárias correspondem a 95% casos. Sua expressividade clínica é determinada pelo tipo de mutação, seu caráter homoplásmico ou heteroplásmico e a associação de distintas mutações dentro do mesmo paciente. Considera-se homoplásmico o tecido que contém somente um tipo de genótipo mitocondrial e heteroplásmico o tecido que contém dois ou mais genótipos mitocondriais.

Wallace, foi o primeiro a identificar uma mutação no nucleotídeo 11778 do genoma mitocondrial (Wallace *et al*, 1998). Esta mutação resulta em uma substituição de histidina por arginina na posição 340 (R340H) da subunidade ND4 do complexo I (NADH: quinona oxidoreductase). Posteriormente, foram detetadas mutações no nucleótido 3460 (Howell *et al*, 1991; Huoponen *et al*, 1991) e 14484 (Johns *et al*, 1992; Mackey and Howell, 1992) em várias famílias portadoras da NOHL. Essas mutações produzem substituições nas posições A52T e M64V, nas subunidades ND1 e ND6 do complexo I, respetivamente.

4.1. Neuropatologia

A neuropatologia da NOHL parece estar limitada à camada de células ganglionares (CG) da retina com poupança do epitélio pigmentar da retina (EPR) e da camada dos fotorreceptores. Há indícios da degeneração marcada do corpo celular e axonal, com desmielinização associada e atrofia observada a partir dos nervos óticos para os corpos geniculados laterais (Man *et al*, 2017).

4.2. Histopatologia

Na histopatologia, ocorre perda das CG, principalmente na retina central. Os pequenos axónios do conjunto papilomacular, localizados centralmente no nervo ótico, são os mais afetados. As investigações histopatológicas também sugerem

uma perda seletiva das células P, e preservação relativa das células M no nervo ótico. Ora, essas características são congruentes com as alterações iniciais no fundo ocular, a discromatopsia, escotoma central e a preservação da resposta pupilar em pacientes com NOHL

4.3. Características Bioquímicas e Fisiopatologia

A NADH desidrogenase ou complexo I é o ponto de entrada dos elétrons nas cadeias respiratórias de muitas bactérias e mitocôndrias de eucariotas; é a primeira enzima da cadeia de transporte eletrônico¹ mitocondrial, catalisando a oxidação do NADH e a redução da coenzima Q. Neste processo, o complexo transloca os prótons através da membrana interna, ajudando na criação de um gradiente eletroquímico utilizado na produção de adenosina- trifosfato (ATP). Um déficit bioenergético e outros mecanismos moleculares (tais como, o aumento de radicais livres e o desequilíbrio redox) contribuiriam para o início clínico da NOHL. O comprometimento da oxidação do NADH que ocorre nas células que possuem as mutações mitocondriais resultaria num aumento da concentração $[NADH] / [NAD^+]$, que induz à diminuição do pH e aumenta a síntese de lactato. Este cenário poderá, então, favorecer o surgimento de efeitos secundários no metabolismo, particularmente quando a demanda de energia é elevada e a glicólise² aumenta em células exigentes de energia (Carelli *et al*, 2004).

Sabe-se que células com defeitos mitocondriais são capazes de manter a carga energética e o crescimento normal das células a partir das moléculas de glicose. No entanto, quando ocorre a substituição da glicose pela galactose, o processo para obtenção de moléculas de glicose-1-fosfato não se revela suficiente para a síntese de ATP necessária para glicólise, e, portanto, as células se tornam

¹ A cadeia de transporte eletrônico na mitocôndria é o local onde ocorre a fosforilação oxidativa, processo que ocorre a fosforilação do ADP em ATP, utilizando para isso a energia libertada nas reações de oxidação-redução.

² É a sequência metabólica composta por um conjunto de dez reações catalisadas por enzimas livres no citosol, na qual a glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e dois equivalentes reduzidos de $NADH^+$, que serão, posteriormente, introduzidos na cadeia respiratória ou na fermentação.

dependentes da fosforilação oxidativa (Carelli *et al*, 2004). Considerando que, as três mutações NOHL primárias envolvem subunidades do complexo I, acredita-se que a função da cadeia respiratória esteja comprometida, levando à deficiência na produção de ATP e a degeneração subsequente de CG da retina como consequência da falha de energia (Man *et al*, 2002; Howell, 1996).

No entanto, estudos bioquímicos *in vitro* e *in vivo*, produziram resultados incongruentes em relação à extensão da disfunção da cadeia respiratória nos casos de NOHL. Essas variações poderiam ser, em parte, resultados de diferentes protocolos utilizados (Man *et al*, 2002).

4.4. Características clínicas

A perda visual, geralmente, acontece entre a 2ª e 3ª década de vida, com a média de aparecimento nos 27 anos.

4.4.1. Fase aguda

Os portadores da NOHL permanecem assintomáticos, até notarem a desfocagem ou turvação da imagem. Na grande maioria dos pacientes, a disfunção visual é bilateral, em que o olho adelfo é afetado simultaneamente ou sequencialmente, com um intervalo médio de 8 semanas. Após 4/6 semanas do aparecimento dos primeiros sintomas, a perda unilateral e indolor evolui em conjunto com o comprometimento da percepção da cor, podendo levar o paciente a atingir a acuidade visual entre 6/60, conta dedos ou até mesmo percepção luminosa. No campo visual, o defeito mais comum corresponde a escotomas centrocecal. A fundoscopia também fornece pistas diagnósticas, em que é possível observarem-se: tortuosidade dos vasos centrais da retina, microangiopatia telangiectásica circumpapilar e edema da camada das fibras nervosas (Man *et al* 2002; Chan, 2007).

4.4.2. Fase crônica

A camada de fibras nervosas degenera-se gradualmente, e após 6 meses a atrofia ótica é uma característica considerada universal da NOHL. Se a avaliação for feita no paciente nesta fase, poderá ser difícil excluir outras possíveis causas da

atrofia, principalmente se não houverem antecedentes familiares conclusivos. Perante tais situações, seria necessário um estudo genético para elucidar o diagnóstico (Man *et al* 2002).

4.4.3. Outras associações

O início da perda visual pode, ocasionalmente, ser associado a cefaleias ou desconforto ocular. Alguns sintomas sistêmicos, semelhantes às da esclerose múltipla, também foram relatados, como o fenômeno de Uhthoff, manifestando-se como piora transitória da visão após exercício ou calor. Além disso, está descrito na bibliografia que 9% dos pacientes com NOHL apresentam arritmias cardíacas, nomeadamente, a síndrome de Wolf-Parkinson-White. Salienta-se ainda que alguns *pedigrees* da NOHL, apresentam a síndrome de Leber “*plus*”, com anomalias neurológicas mais severas, tais como:

- Neuropatia ótica, paraparésia cerebral espástica, alterações esqueléticas e episódios de encefalopatias agudas infantis;
- Neuropatia ótica, distonia e lesões dos gânglios basais na neuroimagem;
- Neuropatia ótica e mielopatia;
- Neuropatia ótica e encefalopatia na primeira infância (Chan, 2007).

4.5. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da NOHL pode ser confirmado por testes genéticos, feito a partir de amostras sanguíneas, para as mutações primárias (11778, 3460 e 14484) (Chan, 2007). Caso a existência dessas não sejam comprovadas, deve-se testar a presença de mutações secundárias.

Quanto ao tratamento sabe-se que ainda não existe disponível nenhum com eficácia comprovada, para melhorar a condição visual final (Man *et al*, 2002, Yen *et al*, 2006). Alguns pesquisadores afirmam que a administração oral de análogos de quinona e suplementação vitamínica (B12 e C) podem acelerar a recuperação visual, porém são necessários mais estudos adicionais antes de se aplicarem esses métodos durante a fase aguda (Man *et al*, 2002).

4.6. Prognóstico

O prognóstico visual nos pacientes com NOHL é variável. O estadió final da doença é caracterizado pela atrofia ótica severa e permanente, bem como a perda visual central com preservação relativa das respostas pupilares á luz. No entanto, estão descritos casos em que se observou a melhora espontânea da acuidade visual, anos depois do início da patologia. Esta recuperação pode ocorrer progressivamente, entre 6 meses a 1 ano, após as primeiras perdas visuais, ou de forma espontânea após 2 a 10 anos. Também pode observar a contração do escotoma ou o aparecimento de pequenas ilhas de visão dentro da área do escotoma central ou cecocentral, comumente bilateral e simétrica (Chan, 2007).

A possibilidade de recuperação visual depender do estado mutacional do paciente, sendo que, aqueles que apresentam mutações do tipo G11778A, tem pior prognóstico, tendo valores de AV entre 1/60 a 3/60, assim como a mutação G3460A. Alguns autores mostraram em seus estudos que pacientes com a mutação do tipo T14484C são mais propensos a mostrar melhorias se a perda visual ocorrer antes dos 20 anos de idade, podendo atingir valores de AV de 6/24. No entanto, é de salientar-se que a maioria dos pacientes não apresentam melhorias funcionais. (Man *et al*, 2002; Chan, p.173, 2007).

V. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização dos pacientes

O estudo seguiu os princípios da Declaração de Helsínquia, que enuncia princípios éticos para a investigação clínica envolvendo seres humanos. Antes da inclusão no estudo, os pacientes concederam, após uma explicação completa sobre os procedimentos, o consentimento informado.

No presente estudo foram avaliados 13 pacientes do mesmo “*pedigree*”, portadores assintomáticos da NOHL, que já haviam sido submetidos a testes genéticos, previamente, onde se confirmou a presença da mutação G11778A. Este mesmo grupo, já havia participado num estudo anterior, cujo objetivo era caracterizar o fenótipo visual inicial, em pacientes assintomáticos.

Os pacientes tinham idades compreendidas entre 15 e 76 anos, com média de 38,88 anos e desvio padrão de 14.55 anos. A AV média é de 1.00 e o desvio padrão de 0.09 (escala decimal). O grupo controlo possuía uma média de idade de 31.28 anos e desvio padrão de 13.48 anos.

Foram excluídos: olhos fáquicos e pseudofáquicos, opacidade dos meios transparentes, doenças neuro-oftalmológicas, patologias retinianas, ambliopia e altas ametropias.

5.2. Avaliação Funcional

Foram aplicados os seguintes métodos psicofísicos e eletrofisiológicos nos pacientes: sensibilidade ao contraste cromático computadorizado, sensibilidade ao contraste acromático computadorizado, perimetria estática computadorizada, eletrorretinograma e potenciais evocados visuais.

5.2.1. Sensibilidade ao Contraste Cromática Computorizado-Cambridge Colour Test (CCT)

O Cambridge Colour Test (CCT) permite tanto o rastreio de defeitos na visão cromática, como pode ser utilizada para avaliação mais detalhada nas alterações na discriminação da cor, que ocorre em decorrência de patologias congénitas ou adquiridas. Além disso, é um método que facilita a monitorização quantitativa, da

progressão ou regressão de patologias, ao longo do tempo. O estímulo tem a forma de C de Landolt, com cromaticidade diferente do fundo. Ambos são compostos por vários discos discretos, com contornos diferentes e luminâncias aleatórias. Como consequência, o paciente só consegue identificar a localização da abertura na presença da visão cromática verdadeira (Mollon e Regan, 2000). Em outras palavras, essa diferença de tamanhos e luminâncias (entre 8 a 18 cd/m²), proporcionam um ruído de fundo, permitindo assim que somente a cromaticidade do estímulo pode ser usada para identificar a localização da abertura (Reis, 2012).

Os limiares psicofísicos foram obtidos utilizando a estratégia escolha forçada de quatro alternativas. Na versão Trivector, os alvos diferem do fundo ao longo de uma das três linhas de confusão, teoricamente, significativas no espaço das cores (Protan, Deutan e Tritan). Estes três tipos de alvo sondam a sensibilidade dos cones de ondas longas (Protan), ondas médias (Deutan) e ondas curtas (Tritan). Os limiares quantitativos foram expressos em comprimento de vetor de confusão para cada um dos eixos, em unidades de espaço de cores da CIE³ 1976 (diagrama $u' v'$). As excursões mínimas e máximas foram 0,002 e 0,11 unidades, respetivamente. Alguns ensaios de controle são ocasionalmente apresentados para deteção de falsos negativos ou positivos (Mollon e Regan, 2000).

O estímulo foi apresentado num ecrã de 21 polegadas (GDM-F520; Sony, Tokyo, Japan) numa sala escura, com todas as fontes de luz (monitores e impressoras) desligadas ou cobertas. Os pacientes, sentados na posição ereta, melhor correção ótica e a uma distância de 1.5m, receberam a instrução para indicar a orientação da abertura do estímulo na caixa de resposta que possui quatro botões (para cima, para baixo, esquerda ou direita). O exame foi feito monocularmente, começando pelo o olho com a melhor acuidade visual.

5.2.2. Sensibilidade ao Contraste Acromática Computorizado-Metropsis

A sensibilidade ao contraste corresponde à quantidade mínima de contraste necessária para detetar uma grade de uma frequência espacial específica. Isto é,

³ Commission Internationale de l'Eclairage

a função de sensibilidade ao contraste (FSC) é, por definição, o inverso da curva de limiar de contraste (1/FSC). Logo, a sensibilidade ao contraste está relacionada à diferença existente entre picos e depressões das ondas. Essa diferença traduz o valor de contraste requerido pelo sistema visual humano, para distinguir um estímulo de frequência espacial daquele com um campo uniforme de luminância média (Santos e Simas, 2001).

No presente estudo, a sensibilidade ao contraste (SC) acromática foi avaliada através do Metropsis (Cambridge Research Systems, Rochester, UK), testando seis frequências espaciais (0.2, 1, 2.1, 3.3, 5.2 e 9.1 ciclos/grau), através do estímulo de Gabor, apresentado a 90°, com uma fase espacial de 180 °.

Durante o exame o paciente encontrava-se sentado na posição ereta, com a melhor correção ótica, a uma distância de 1.5m e foi instruído para indicar, na caixa de resposta, o lado onde o estímulo aparecia (esquerda ou direita), em relação ao ponto de fixação; os limiares psicofísicos foram obtidos através da estratégia de escolha forçada de duas alternativas. Os estímulos foram apresentados monocularmente, e tal como no CCT, num monitor de 21 polegadas (GDM-F520; Sony, Tokyo, Japan), com uma luminância de 71 cd/m², numa sala escura, com todas as fontes de luz (monitores e impressoras) desligadas ou cobertas, durante 200 ms a dois graus do ponto de fixação central. Alguns ensaios de controle foram aleatoriamente apresentados com o objetivo de detetar falsos negativos ou positivos. O contraste do estímulo foi modulado de acordo com o contraste de luminosidade de Michelson, em que (%) = $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\max} + L_{\min}) \times 100$ e os limites de sensibilidade ao contraste foram obtidos por um logarítmico adaptativo da estratégia de “*staircase*” (inciando com 50% de contraste). Os resultados dos limiares foram expressos em percentagem de contraste (Reis,2012).

5.2.3. Perimetria Estática Computorizada

A perimetria estática computadorizada (PEC) foi realizada com a versão do Octopus 311 (HAAG- STREIT), utilizando o programa 32, incluindo 76 locais até os 30°. O campo visual é realizado numa sala em ambiente escotópico, com o paciente corretamente posicionado em frente ao aparelho que apresentava pontos de luz em diversos pontos da cúpula, e foi instruído a acionar a campainha em sua mão, para

sinalizar a percepção ao estímulo. O paciente foi elucidado da importância de manter a fixação os olhos durante o exame, para a fiabilidade do mesmo. Salienta-se que o exame foi feito com o paciente na sua melhor condição ótica.

Os limiares locais, expressos em decibels (dB) (Weijland *et al*, 2004), foram obtidos de forma otimizada, tendo em consideração as respostas de cada ponto no ajuste dos locais vizinhos (algoritmo de estratégia TOP). A sensibilidade média (mean sensitivity- MS), o defeito médio (mean defect- MD) e a variância da perda (loss variance- LV) são os parâmetros globais que foram analisados (Reis, 2012) e comparados com os resultados prévios.

5.2.4. PEV Pattern

Os Potenciais Evocados Visuais (PEV) podem fornecer informações importantes sobre a integridade funcional do sistema visual. Em outras palavras, o PEV testa a função das vias visuais a partir da retina até o córtex occipital. O exame para este estudo foi feito, segundo, o protocolo estabelecido pelo *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV) (Odom *et al*, 2010).

Para estimulação e registo eletrofisiológico utilizou-se o RETIport32 (Roland Consult, Germany), com a apresentação do estímulo que consiste num padrão reverso semelhante a um “tabuleiro de xadrez”, num monitor de 20 polegadas com nível de contraste de 97%. Segundo o protocolo da ISCEV, a distância é tipicamente entre 50 e 150 cm, mas pode ser ajustado para obter um tamanho de campo adequado e a verificação necessária de tamanhos para qualquer dimensão físico da tela de exibição; para o presente estudo, o exame foi feito a 1 m de distância, em ambiente escotópico. Durante a preparação dos pacientes, fez-se a limpeza do couro cabeludo com creme abrasivo, e posteriormente, colocou-se cada elétrodo (com pasta condutora) em suas posições, verificando sempre a impedância dos mesmos, que deveriam ser abaixo de 5 k Ω , medido entre 10 e 100 Hz. Ao longo do exame, duas frequências espaciais (60' e 15') foram apresentadas monocularmente, com 1.5 inversões/segundo, numa frequência de 60Hz, e com o paciente na sua melhor condição de ótica (Odom *et al*, 2010, Reis, 2012). Posteriormente, as amplitudes e tempo de culminação da onda P100 foram analisados e comparados com os resultados obtidos em 2010.

5.2.5. ERG Pattern

O ERG *pattern* corresponde à resposta retiniana evocada por um padrão reverso, semelhante a um tabuleiro de xadrez, e cuja resposta fornece informações sobre a função macular das células ganglionares, uma vez que o estímulo é percebido pela fixação central. Clinicamente, o ERG *pattern* pode ser utilizado em pacientes que apresentam um PEV pattern anormal, uma que permite complementar e diferenciar o diagnóstico entre uma disfunção da retina central ou do nervo óptico. Pode, ainda, ser utilizado para detecção e monitorização do comprometimento de células ganglionares decorrentes de patologias como glaucoma, neuropatias ótica, entre outros. Considerando a importância que este exame tem para prática neurológica e oftalmológica, o ISCEV estabeleceu um protocolo com procedimentos que permitam que respostas reproduzíveis sejam registradas em condições bem definidas (Bach *et al*, 2012).

Para o presente estudo, o exame foi realizado seguindo este protocolo, utilizando o RETIport32 (Roland Consult, Germany) para estimulação de respostas eletrofisiológicas, e também, os elétrodos DTL- Plus para registrar as respostas das CG. Ao longo do exame o paciente encontrava-se sentado, com a cabeça bem posicionada e estável, e sem dilatação das pupilas. Após a limpeza da pele feita com pasta abrasiva, os elétrodos foram cuidadosamente posicionados de modo a minimizar a instabilidade, tendo sempre a atenção para que a impedância fosse menor que 10 k Ω . O estímulo consistiu num padrão reverso, com elementos de 48' a 4.3 inversões/segundo, a um nível de contraste de 97%, apresentado binocularmente, tendo sempre em consideração a melhor condição ótica do paciente, a uma distância de 1m, num monitor de 20 polegadas. O alcance de tensão ativa do sinal bioelétrico foi de +/- 100 μ V, utilizando o filtro *band-pass* de 5-50 Hz, e amplificação com ganho de 100.000 (Bach *et al*, 2012; Reis, 2012). A média das ondas N35-P50 e P50-N95, bem como o ratio N95/P50, foram analisados e comparados com os resultados dos pacientes, obtidos em 2010, e com o grupo controlo.

5.2.6. ERG multifocal

O ERG multifocal (ERGmf) foi desenvolvido com o objetivo de fornecer uma medida topográfica da atividade eletrofisiológica da retina. Esta técnica permite registrar respostas de vários pontos (geralmente 61 ou 103), a partir da via dos cones, após a adaptação à luz. As respostas eletrofisiológicas da retina são registradas através um elétronodo corneano, tal como acontece no ERG full field. Contudo, a natureza do estímulo e a forma de análise diferem; são essas diferenças que permitem estabelecer um mapa topográfico da atividade de cada ponto retiniano. A onda típica da resposta do ERGmf, também denominada de resposta de primeira ordem, é uma onda bifásica com uma deflexão negativa inicial, seguida de um pico positivo. Geralmente, após este pico, ocorre uma segunda deflexão negativa. Estes três picos são denominados N1, P1 e N2, respetivamente (Hood *et al*, 2012).

O exame foi feito segundo o protocolo do ISCEV, que, em 2003, publicou diretrizes para o registo do ERGmf, e que foram revisadas em 2007. O registo topográfico retiniano foi realizado através do sistema RETIscan (Roland Consult, Germany), usando os elétrodos DTL- plus, tendo com objetivo registrar a atividade dentro do circuito fotorreceptor/ célula bipolar. O estímulo consistiu num padrão hexagonal, preto e branco, com 61 elementos, ajustado ao fator de ampliação dentro dos 30º centrais do campo visual. Foi apresentado binocularmente, de acordo com o padrão da sequência-m, a uma distância de 33 cm num monitor CRT (Cathodic Ray Tube) de 20 polegadas, com frequência de 60Hz. Com as pupilas completamente dilatadas, os pacientes sentaram-se em frente à tela com o queixo na mentoneira e testa encostada ao apoio, sendo instruídos a fixar no alvo central (a fixação foi monitorada ao longo da realização do exame). A amplitude de voltagem ativa do sinal bioelétrico foi de +/- 200 µV, utilizando um filtro “*band-pass*” de 5-100 Hz, e amplificação de 100.000. Foram obtidos 8 ciclos, com um nível de rejeição ao artefacto de 10%. As análises foram realizadas utilizando as repostas de primeira ordem. Para cada hexágono, calculou-se a amplitude do pico, definida como a diferença entre ondas N1 e P1 e determinou o tempo implícito de P1, em amplitude por área (nV / deg²) e em milissegundos (ms), respetivamente (Hood *et al*, 2012; Reis, 2010). Salienta-se que o exame foi feito em ambiente mesópico.

5.3. Avaliação Estrutural

5.3.1. Retinografia

A Retinografia é um exame de imagem, em que se fotografa as áreas do fundo do olho com o objectivo de acompanhar a evolução de determinadas doenças, e deve ser feito periodicamente, dependendo da patologia (Carvalho, 2006). O exame foi feito com a iCam (Optovue), com o paciente sentado o mais confortavelmente possível, com a cabeça bem posicionada e estável, e pupilas dilatadas.

As retinografias foram feitas em ambos olhos, centrados à macula e no disco ótico, com objetivo de registrar as características dessas estruturas. As fotografias eram feitas após os exames psicofísicos e eletrofisiológicos.

5.3.2. Tomografia de coerência ótica (OCT)

A Tomografia de Coerência Ótica (OCT) é um exame de imagem do fundo ocular, não invasivo, que permite a obtenção in vivo de um corte histológico das diferentes camadas da retina, da fóvea e do disco óptico (Costa et al, 2006).

O exame foi feito usando o aparelho Cirrus HD-OCT (Model: 5000; Zeiss), com o paciente sentado confortavelmente, queixo apoiado na mentoneira e testa encostada no apoio e pupilas dilatadas. Antes da aquisição das imagens, pediu-se aos pacientes para olharem através da abertura e manterem a fixação no alvo verde que se apresentava sobre um fundo preto. Usaram-se os seguintes protocolos de aquisição:

- Macular cube 512x128: gera um cubo de dados através de uma grade quadrada de 6 mm adquirindo uma série de 128 linhas de scan horizontal, cada uma composta por 512 A-scans. Além disso, um scan cruzado de alta definição é adquirido em primeiro lugar. Cada scan de alta definição é composto por 1024 A-scans.

- Optic Disc Cube 200x200: Gera um cubo de dados através de uma grade quadrada de 6 mm por adquirindo uma série de 200 linhas de scan horizontal, cada uma composta por 200 A-scans. O alvo de fixação se desloca para permitir que o centro do nervo óptico se mova para o centro do padrão de varredura. Além disso,

a sobreposição do padrão de varredura consiste em anéis concêntricos para auxiliar no alinhamento do disco óptico (Cirrus HD-OCT User Manual, SD).

5.4. Análise Estatística

O *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) é um software apropriado para a elaboração de análises estatísticas de matrizes de dados. O seu uso permite gerar relatórios tabulados, gráficos e dispersões de distribuições utilizados na realização de análises descritivas e de correlação entre variáveis (Pocinho e Figueiredo, SD). Para a análise dos dados obtidos, foi necessário basear-se em testes de hipóteses usando o p -valor. Este é definido como a probabilidade de obter-se uma estatística de teste igual ou mais extrema que a estatística observada a partir da amostra de uma população assumindo-se a hipótese nula como verdadeira. Para este estudo, considerou-se o intervalo de confiança de 95%, e o p -valor igual a 0,05.

Para análise e comparação, teve em consideração a distribuição das variáveis, sendo, portanto, utilizados:

a) Teste paramétricos:

- Teste T de Student, para amostras emparelhadas- para comparar as médias de duas variáveis ou características para uma mesma amostra de indivíduos;

- Análise de Variância (ANOVA) é um procedimento utilizado para comparar três ou mais tratamentos. Existem muitas variações da ANOVA devido aos diferentes tipos de experimentos que podem ser realizados (Pocinho e Figueiredo, SD).

b) Testes não- paramétricos:

- Teste de Wilcoxon: para comparar se as medidas de posição de duas amostras são iguais no caso em que as amostras são dependentes.

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterização dos pacientes

Os pacientes portadores da mutação mitocondrial que participaram no estudo apresentaram a média de idades \pm SD = 38,88 \pm 14,55 anos e a média de AV \pm SD = 1,00 \pm 0,09 (escala decimal).

6.2. Avaliação funcional

6.2.1. Sensibilidade ao Contraste Cromática Computorizado

Tendo em conta que as variáveis relacionadas com a resposta ao CCT para cada eixo cromático apresentaram um comportamento assimétrico, fez-se a comparação entre os valores de cada eixo encontrados em 2017, com o seu correspondente do ano de 2010, observou-se que o eixo Protan apresentou com alterações estatisticamente significativas ($p= 0,019$), rejeitando, desse modo, a hipótese nula (valores não são diferentes).

Test Statistics ^a			
	CCTProtan2017 - CCTProtan2010	CCTDeutan2017 - CCTDeutan2010	CCTTritan2017 - CCTTritan2010
Z	-2,314	-1,088	-,157
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021	,277	,875
Exact Sig. (2-tailed)	,019	,286	,883
Point Probability	,000	,004	,006

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 1- Teste de Wilcoxon. Rejeita-se a hipótese nula para o eixo protan.

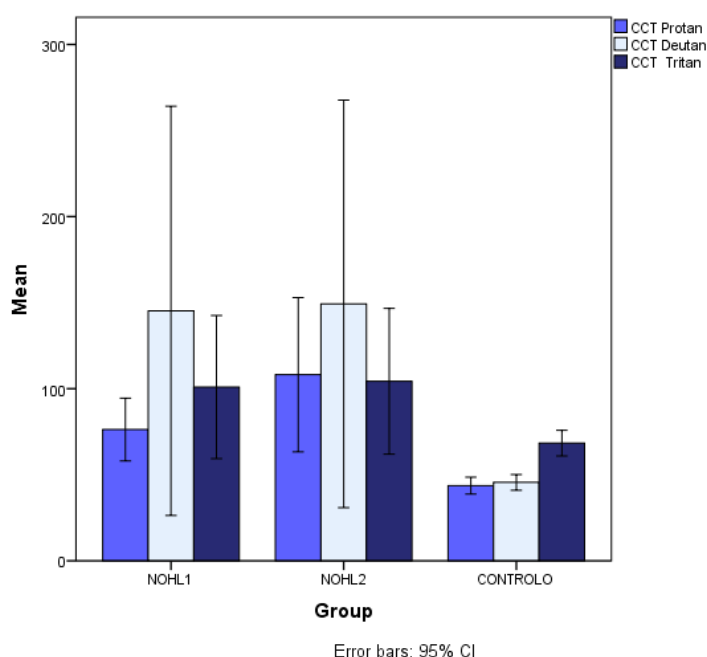


Gráfico 1- Comparação dos eixos cromáticos entre os diferentes grupos.

6.2.2. Sensibilidade ao Contraste Acromática Computorizado

Verificou-se pela análise estatística dos dados obtidos alterações significativas nas frequências espaciais baixas e altas, sendo que as médias se revelaram preservadas; sugerindo assim o comprometimento das vias magno e parvocelular.

Test Statistics ^a						
	0,2 Contrast2017 - 0,2 Contrast2010	1,0 Contrast2017 - 1,0 Contrast2010	2,1 Contrast2017 - 2,1 Contrast2010	3,3 Contrast2017 - 3,3 Contrast2010	5,2 Contrast2017 - 5,2 Contrast2010	9,1 Contrast2017 - 9,1 Contrast2010
Z	-2,408	-2,892	-2,247	-1,009	-1,170	-2,193
Asymp. Sig. (2-tailed)	,016	,004	,025	,313	,242	,028
Exact Sig. (2-tailed)	,015	,003	,024	,325	,252	,027
Point Probability	,001	,000	,001	,007	,006	,001

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

Tabela 2-Teste de Wilcoxon. O comprometimento das baixas e altas frequências apresentam valores de $p < 0,05$.

6.2.3. Perimetria Estática Computorizada

A sensibilidade média (mean sensitivity- MS), o defeito médio (mean defect- MD) e a variância da perda (loss variance- LV) encontrados na segunda visita dos pacientes revelaram-se superiores aos da primeira visita.

Paired Samples Test							
		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	MS (dB)10 - MS (dB)17	-2,3292	2,7555	,5625	-4,141	23	,000
Pair 2	MD (dB)10 - MD (dB)17	2,7583	2,7096	,5531	4,987	23	,000
Pair 3	LV (dB)10 - LV (dB)17	6,7208	10,1446	2,0708	3,246	23	,004

Tabela 3- Resultados do teste T de Student para amostras emparelhadas.

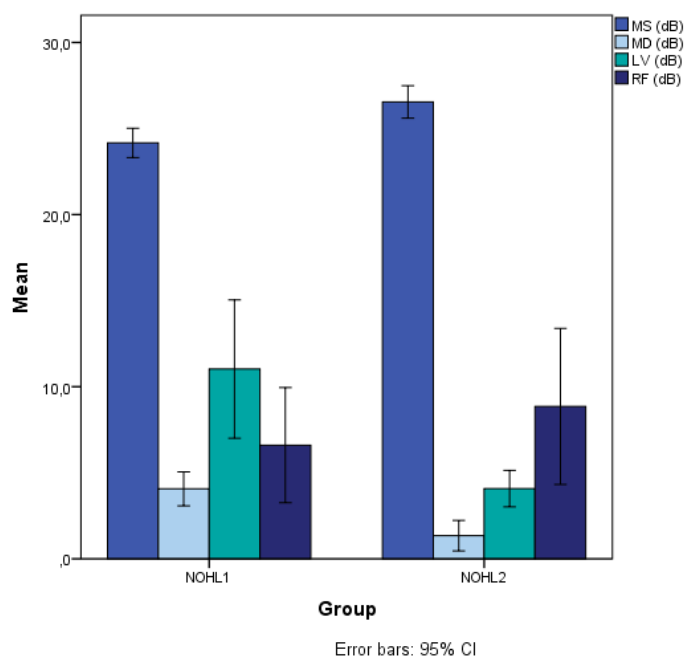


Gráfico 2- Comparação dos resultados obtidos em 2010 (NOHL1) e 2017 (NOHL2).

6.2.4. PEV pattern

Os resultados apontam que a diferença das médias para cada par, não são estatisticamente significativas (Par 1: $p=0,107$; Par 2: $p=0,201$). Em outras palavras, os tempos implícito das ondas P100, nos pacientes portadores da mutação, para ambos estímulos, não sofreram alterações ao longo do tempo.

Paired Samples Test							
		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	PEVP100ms602010 - PEVP100ms602017	-5,41667	15,81666	3,22856	-1,678	23	,107
Pair 2	PEVP100ms152010 - PEVP100ms152017	-4,62500	17,21933	3,51488	-1,316	23	,201

Tabela 4- Teste de Hipótese T para amostras emparelhadas; $p > 0.05$ para todos os pares.

No entanto, através do teste de Scheffé, pode-se fazer comparações múltiplas, entre os três grupos⁴, e percebeu-se que a diferença das médias entre o tempo de culminação da onda P100, para ambos estímulos, obtidas na segunda visita dos pacientes (NOHL2) e o grupo Controlo, é estatisticamente significativa; isto é, o aumento que se verificou poderá ser indício do comprometimento no processamento retinocortical.

Multiple Comparisons					
Scheffe					
Dependent Variable	(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
PEV P100 (ms) 60'	NOHL1	NOHL2	-4,972	2,981	,256
		CONTROLE	3,125	3,012	,586
	NOHL2	NOHL1	4,972	2,981	,256
		CONTROLE	8,097*	2,981	,030
	CONTROLE	NOHL1	-3,125	3,012	,586
		NOHL2	-8,097*	2,981	,030
	NOHL1	NOHL2	-4,302	2,826	,320
		CONTROLE	3,833	2,854	,411
PEV P100 (ms) 15'	NOHL1	NOHL2	-4,302	2,826	,320
		CONTROLE	3,833	2,854	,411
	NOHL2	NOHL1	4,302	2,826	,320
		CONTROLE	8,135*	2,826	,020
	CONTROLE	NOHL1	-3,833	2,854	,411
		NOHL2	-8,135*	2,826	,020

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabela 5-Comparação do tempo implícito para a onda P100, nos diferentes grupos.

⁴ NOHL 1: primeira avaliação dos pacientes em 2010; NOHL 2: segunda avaliação dos pacientes em 2017; Controlo.

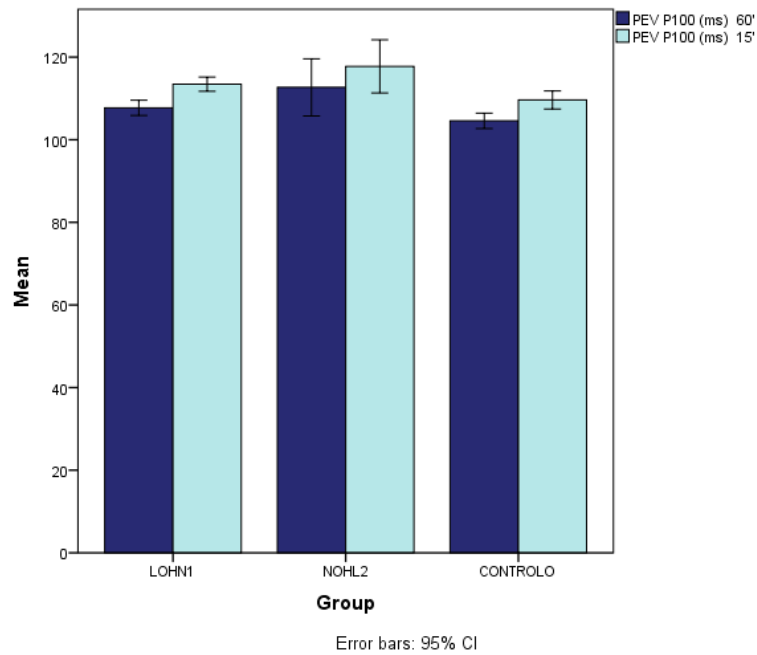


Gráfico 3-Comparação entre o tempo implícito das ondas P100, dos diferentes grupos.

Além disso, nota-se que houve uma redução expressiva das amplitudes das ondas N75-P100 no intervalo de tempo, entre a primeira e a segunda visita dos pacientes, em ambos estímulos. No entanto, quando se compara com o grupo controlo, essa diminuição das amplitudes das ondas não se revela estatisticamente significativa, o que leva a crer que as respostas corticais se mantiveram preservadas.

Paired Samples Test

		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	PEVN75P100µV602010 - PEVN75P100µV602017	5,24087	6,10981	1,27398	4,114	22	,000
Pair 2	PEVN75P100µV152010 - PEVN75P100µV152017	5,01625	6,23754	1,27323	3,940	23	,001

Tabela 7- Teste de hipótese T de Student para amostras emparelhadas. Diferença das médias da amplitude N75-P100, para ambos estímulos, revelam-se estatisticamente significativas.

Multiple Comparisons

Scheffe

Dependent Variable	(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
PEV N75 - P100 (µV) 60'	NOHL1	NOHL2	5,834*	1,769	,006
		CONTROLE	3,041	1,769	,235
	NOHL2	NOHL1	-5,834*	1,769	,006
		CONTROLE	-2,793	1,769	,294
	CONTROLE	NOHL1	-3,041	1,769	,235
		NOHL2	2,793	1,769	,294
PEV N75 - P100 (µV) 15'	NOHL1	NOHL2	5,3967*	1,6810	,008
		CONTROLE	3,2821	1,6981	,162
	NOHL2	NOHL1	-5,3967*	1,6810	,008
		CONTROLE	-2,1146	1,6810	,457
	CONTROLE	NOHL1	-3,2821	1,6981	,162
		NOHL2	2,1146	1,6810	,457

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tabela 6-Comparação da amplitude das ondas N75-P100, nos diferentes grupos.

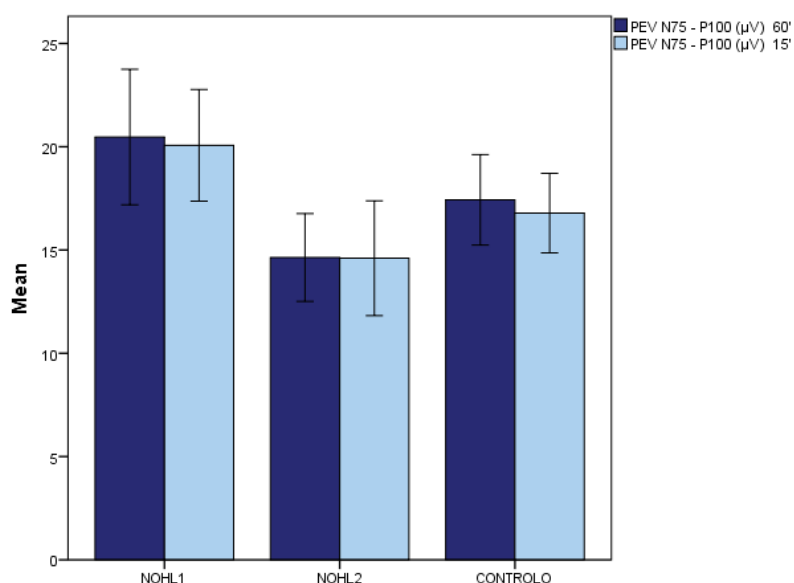


Gráfico 4-Comparação entre as amplitudes da onda P100, dos diferentes grupos.

6.2.5. ERG pattern

Depois de confirmada o comportamento normal das variáveis, pelo teste Kolmogorov-Smirnov, e aplicada o teste T de Student para amostras emparelhadas observou-se que a diferença das médias, do par 1 (média da amplitude das ondas N35-P50) é estatisticamente significativa, apresentando um valor de p igual a 0,018.

Paired Samples Test							
		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	PERGN35P50µVmédia2010 - PERGN35P50µVmédia2017	-,587083	1,128039	,230260	-2,550	23	,018
Pair 2	PERGP50N95µVmédia2010 - PERGP50N95µVmédia2017	-,699583	1,762089	,359685	-1,945	23	,064
Pair 3	PERGRatioN95P50µV2010 - PERGRatioN95P50µV2017	,068718	,262857	,053655	1,281	23	,213

Tabela 8- Média das amplitudes das ondas N35-P50 de 2017 encontram-se superiores, que os valores obtidos em 2010.

Quando se fez a comparação entre os 3 grupos constatou-se que as médias das amplitudes das ondas P50 e N95, apresentaram valores superiores aos controlos (P50: $p = <0.0005$; N95: $p = <0.0005$); no entanto, a relação N95/ P50

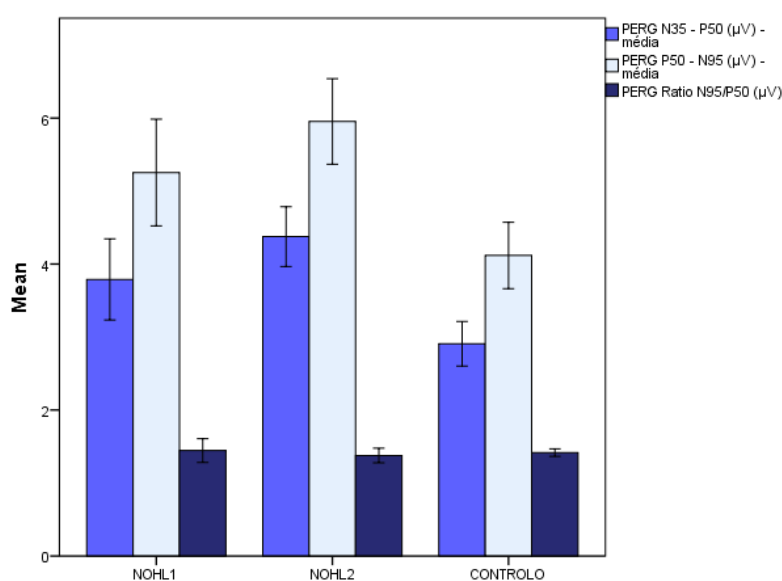


Gráfico 5-Comparação de médias das amplitudes das ondas P50 e N95, como o ratio N95/P50, nos diferentes grupos.

encontrava-se normal em todos os grupos, sugerindo desse modo a preservação das respostas celulares, nos portadores da mutação mitocondrial.

6.2.6. ERG multifocal

Os resultados obtidos no ERG multifocal, apresentaram uma distribuição normal e, portanto, aplicou-se o teste T de Student para amostras emparelhadas. Como resultado, percebeu-se que houve reduções significativas das amplitudes das ondas P1, na segunda visita, de todos os anéis, com exceção do anel central.

Paired Samples Test							
		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	ERGmf12010 - ERGmf12017	5,652	22,356	4,471	1,264	24	,218
Pair 2	ERGmf22010 - ERGmf22017	5,610	9,812	1,962	2,859	24	,009
Pair 3	ERGmf32010 - ERGmf32017	3,778	5,692	1,138	3,318	24	,003
Pair 4	ERGmf42010 - ERGmf42017	3,735	3,924	,785	4,759	24	,000
Pair 5	ERGmf52010 - ERGmf52017	2,752	3,734	,747	3,685	24	,001

Tabela 9- Diferença das médias das amplitudes das ondas P1, nos diferentes anéis do ERGmf.

Comprovou-se que houve alterações das amplitudes da onda P1 entre os grupos avaliados. Todos os anéis tiveram redução significativa das amplitudes da onda P1 (ring 1: $p=0.014$; ring 2: $p=0.001$; ring 3: $p=0.001$; ring 4: $p<0.0005$; ring 5: $p=0.002$).

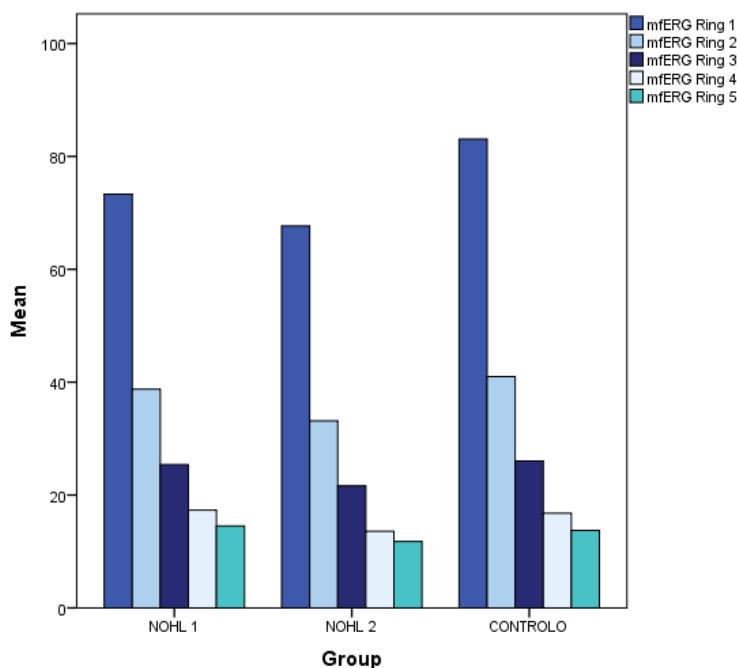


Gráfico 6- Comparação da amplitude da onda P1 dos diferentes anéis, entre os três grupos.

6.3. Avaliação Estrutural

6.3.1. Tomografia de coerência ótica (OCT)

Houve um aumento dos valores obtidos na segunda visita, para cada um dos anéis, de tal modo que, ao aplicar-se o Teste T de Student, verificou-se que a diferença entre das médias para cada anel é estatisticamente significativa.

		Paired Differences			t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean			
Pair 1	OCTRing12010 - OCTRing12017	-49,750	26,836	5,478	-9,082	23	,000
Pair 2	OCTRing22010 - OCTRing22017	-45,615	17,742	3,622	-12,595	23	,000
Pair 3	OCTRing32010 - OCTRing32017	-38,646	12,063	2,462	-15,694	23	,000

Verificou-se um aumento dos valores em todos os anéis: centrais, pericentrais e periféricos (ring 1: $p= 0.001$; ring 2: $p= 0.001$; ring 3; $p< 0.005$), do grupo “NOHL 2” em relação aos restantes.

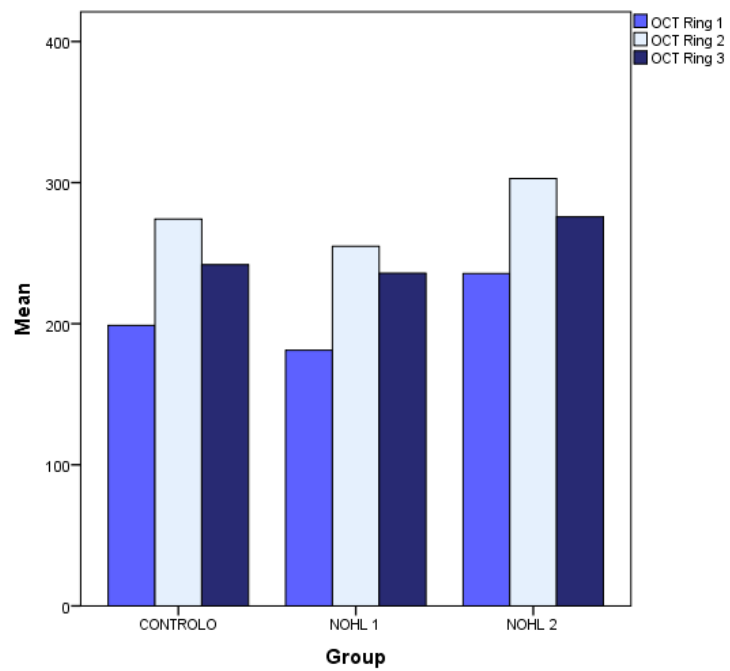


Gráfico 7- comparação da espessura dos aneis centrais, pericentrais e periféricos, nos diferentes grupos.

VII. DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que os pacientes assintomáticos, portadores da NOHL, apresentaram evolução da patologia. Reis (2012), mostrou em seu estudo que esses pacientes apresentavam o comprometimento nas vias parvo e coniocelular, demonstrado nos resultados da sensibilidade ao contraste cromático. Comparativamente aos resultados obtidos neste estudo, pode-se verificar que o eixo vermelho-verde (protan) apresentou um aumento significativo dos valores, sugerindo então, o comprometimento acentuado da via parvocelular, o que vai de encontro com o que fora postulado por Ventura *et al* (2007), que diz que esta via é a mais afetada nos pacientes assintomáticos.

Ora, tal como foi descrito por Ventura *et al* (2005), esse comprometimento da via parvocelular ficou ainda mais evidente na sensibilidade ao contraste acromático, uma vez que esta responde a variações de luminância nas altas frequências espaciais. Os resultados obtidos em 2010, apontavam para a preservação da via magnocelular (Reis, 2012). No entanto, tal como descrito por Ventura *et al* (2005), a redução da sensibilidade ao contraste para frequências baixas, verificado nos resultados atuais, indicam o comprometimento desta via.

Ao variar as frequências espaciais é possível determinar a ativação prevalente de diferentes componentes neuronais das vias visuais com base no tamanho dos campos recetivos retinianos, de modo a evocar respostas corticais por diferentes populações de axônios com condução neuronal de velocidade variável (Ziccardi *et al*, 2013). Os dados apresentados por Reis (2012) apontavam para a preservação das respostas corticais. No entanto, resultados do PEV *pattern* demonstraram a redução das amplitudes das ondas N75- P100 para ambos estímulos, entre o mesmo grupo, acompanhado de atraso no tempo implícito encontrada na segunda visita, comparativamente ao grupo controlo, o que poderá ser interpretado como um possível comprometimento condução dos impulsos nervosos, ao longo dos axónios menores e maiores.

VIII. CONCLUSÕES

Em virtude dos resultados encontrados, pode-se concluir que houve a progressão da patologia, registada, principalmente, pelas alterações progressivas, não só, da via parvocelular, como também, da via magnocelular. Além disso, os resultados obtidos no PEV *pattern*, sugerem uma diminuição na resposta cortical, não verificada, no estudo anterior.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barboni, P., MD, Carbonelli, M., MD, Savini, G., MD, Ramos, C.V.F., MD, Carta, A., MD, Berezovsky, A., PhD, Salomao, S.R., PhD, Carelli, V., MD, PhD, Sadun, A.A., MD, PhD (2010). *Natural History of Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Longitudinal Analysis of the Retinal Nerve Fiber Layer by Optical Coherence Tomography*. Ophthalmology Volume 117, Number 3, March.
- Benardete, E.A. and Kaplan, E. (1999). The dynamics of primate M retinal ganglion cells. Visual Neuroscience, 16, 355–368. Printed in the USA.
- Bicas, Harley E.A. (1997). Morfologia do Sistema Visual. Simpósio: Oftalmologia para o clínico Capítulo 1. Medicina, Ribeirão Preto, 30:7-15, Jan/Mar.
- Carellia, V., Rugolob, M., Sgarbic, G., Ghellib, A., Zannab, C., Baraccad, A., Lenazd, G., Napolie, E., Martinuzzie, A., Solainic, G. (2004). *Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration*. Biochimica et Biophysica Acta 1658, 172– 179.
- Chalmers, R.M., Schapira, A.H.V. (1999). *Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy*. Biochimica et Biophysica Acta 1410, 147-158.
- Fielder, A.R. (SD). *Anatomy and Physiology of the Retina*.
- Guy, J.MD, Qi, X., MD, Pallotti, F., MD, PhD, Schon, E.A., PhD, Manfredi, G., MD, Carelli, V., MD, PhD, Martinuzzi, A., MD, PhD, Hauswirth, W.W., PhD, and Lewin, A.S., PhD (2002). *Rescue of a Mitochondrial Deficiency Causing Leber Hereditary Optic Neuropathy*. Annals of Neurology Vol 52 No 5 November.
- Holder, G. E., Brigell, M. G., Hawlina, M., Meigen, T. , Vaegan, Bach, M. (2007). *ISCEV standard for clinical pattern electroretinography* . Doc Ophthalmol 114:111– 116.
- Howell, N. (1997). *Leber Hereditary Optic Neuropathy: Mitochondrial Mutations and Degeneration of the Optic Nerve*. Vision Res., Vol. 37, No. 24, pp. 3495-3507.
- Howell, N., Bindoff, A., McCullough, D.A., Kubacka, I., Poulton, J., Mackey, D., Taylor, L., Turnbull, D.M., (1991). *Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees*. Am. J. Hum. Genet. 49, 939–950.

- Huoponen, K., Villki, J., Aula, P., Nikoskelainen, E.K., Savontaus, M.L. (1991). *A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy*. *Am. J. Hum. Genet.* 48, 1147–1153.
- Jalali, S., Holder, G.E., Ram, L.S.M., Vedantam, V. (SD). *Visual electrophysiology in the clinic: A basic guide to recording and interpretation*. All India Ophthalmological Society.
- Johns, D.R., Neufeld, M.J., Park, R.D. (1992). *An ND6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1551–1557.
- Lennie, P., Fairchild, M.D. (1994). *Ganglion Cell Pathways for Rod Vision*. *Vision Res.* Vol. 34, NO. 4, pp. 477- 482.
- Letters to the Editor (1996). *Primary Pathogenic mtDNA Mutations in Multigeneration Pedigrees with Leber Hereditary Optic Neuropathy*. *Am. J. Hum. Genet.* 59:481-485.
- Mackey, D., Howell, N. (1992). *A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology*. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 1218–1228.
- Monteiro, M.L.R. (2012). *Avaliação da camada de fibras nervosas da retina nas afecções neurooftalmológicas da via óptica anterior*. *Revista Brasileira Oftalmologia*; 71 (2): 125-38.
- Odom, J. V., Bach, M., Brigell M., Holder, G. E. • McCulloch, D.L., Tormene A. P. (2010). *ISCEV standard for clinical visual evoked potentials (2009 update)*. *Doc Ophthalmol*, 120:111–119 DOI 10.1007/s10633-009-9195-4.
- P Y W Man, D M Turnbull, P F Chinnery (2002). *Leber hereditary optic neuropathy*. *J Med Genet*; 39:162–169.
- Ramos, M.F. (2001). *Problemas da Visão*. Monografia Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília.
- Reis, A.S.A.C.P. (2012). *Ganglion cell and optic nerve physiology in health and disease*. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Santos, N.A., Simas, M.L.B. (2001). *Função de Sensibilidade ao Contraste: Indicador da Percepção Visual da Forma e da Resolução Espacial*. Universidade Federal de Pernambuco. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, 14 (3), pp. 589-597.

Santos, R.O. (2002). *Estrutura e Funções do Córtex Cerebral*. Centro Universitário de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde. Monografia.

Ventura DF, Gualtieri M, Oliveira AG, et al.: Male prevalence of acquired color vision defects in asymptomatic carriers of Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2362-2370.

Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., Nikoskelainen, E.K. (1998). *Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy*. *Science* 242, 1427–1430

Weijland, A., Fankhauser, F., Bebie, H., Flammer, J. (2004). *Automated Perimetry*. 5ª Edition

Yen, M.Y., Wanga, A.G., Wei, Y.H. (2006). *Leber's hereditary optic neuropathy: A multifactorial disease*. *Progress in Retinal and Eye Research* 25 381–396.